



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Off nl gungsschrift  
⑩ DE 44 46 698 A 1

⑤1 Int. Cl.<sup>6</sup>:  
B01 L 3/00  
G 01 N 31/22  
G 01 N 21/80  
G 01 N 33/53

②1 Aktenzeichen: P 44 46 698.6  
②2 Anmeldetag: 14. 12. 94  
④3 Offenlegungstag: 27. 8. 96

DE 44 46 698 A 1

⑦1 Anmelder:  
Medac Gesellschaft für klinische Spezialpräparate  
mbH, 20354 Hamburg, DE

⑦4 Vertreter:  
Uexküll & Stolberg, 22607 Hamburg

⑦2 Erfinder:  
Nothacker, Klaus-Dieter, Dr., 23936 Schmachthagen,  
DE

⑤8 Entgegenhaltungen:  
DE 35 06 365 A1  
GB 21 77 508 A  
US 53 20 807  
US 49 35 347  
EP 02 51 471 A1

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Analysengefäß mit Mitteln zur Anzeige des Befüllungszustandes

⑤7 Es wird ein Analysengefäß zur Aufnahme von zu analysie-  
renden Flüssigkeiten und mit Mitteln zur Anzeige des  
Befüllungszustandes beschrieben, wobei die Mittel pH-Indi-  
katoren sind, die zumindest auf Teilen der Oberflächen des  
Analysengefäßes vorhanden sind, welche mit den Flüssigkei-  
ten in Kontakt kommen.

DE 44 46 698 A 1

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Analysengefäß zur Aufnahme von zu analysierenden Flüssigkeiten und mit Mitteln zur Anzeige des Befüllungszustandes und insbesondere ein Analysengefäß, welches in Form einer Mikrotiterplatte vorliegt.

Bei der Durchführung von Flüssigkeitsanalysen werden je nach eingesetztem Analysenverfahren unterschiedliche Analysengefäße verwendet. Bei immunologischen Tests werden zum Beispiel Mikrotiterplatten mit festphasengebundener immunreaktiver Komponente verwendet.

Bei Mikrotiterplatten handelt es sich in der Regel um Kunststoffplatten mit einer Vielzahl von Vertiefungen oder Näpfen. Gängige Mikrotiterplatten haben zum Beispiel insgesamt 96 Vertiefungen mit einem Fassungsvermögen von jeweils 300 bis 400 µl. Sie werden insbesondere für die verschiedensten mikrobiologischen und immunologischen Arbeitsgänge, wie zum Beispiel ELISA, eingesetzt.

Der ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay) wird heutzutage in großem Umfang zur Bestimmung verschiedenster Analyte in Körperflüssigkeiten, wie zum Beispiel Blutserum, Liquor, Urin, Speichel und Sekreten, verwendet. Als zu analysierende Materialien kommen jedoch auch solche nicht-humanen oder nicht-animale Ursprungs, wie Grundwasser, in Frage. Dieses läßt sich mittels ELISA zum Beispiel auf Pestizidrückstände untersuchen.

Allgemein ist es bei der Durchführung von Enzymimmunoassays wünschenswert, nicht-modifizierte Originalproben einzusetzen, da dadurch vor allem bei einer großen Anzahl an Untersuchungen eine sehr aufwendige Vorverdünnung entfallen kann. Weiter wird angestrebt, daß die Menge an erforderlichem Probenvolumen sehr klein ist, da damit häufig notwendige Wiederholungsmessungen und weitere erforderliche Untersuchungen überhaupt erst ermöglicht werden. So ist es z. B. bei Seren von Säuglingen wichtig, daß auch schon geringe Abnahmemengen für die Durchführung des Tests ausreichen.

Die Verwendung von kleinen Probenvolumina hat aber gerade bei ELISA-Tests mit einer Mikrotiterplatte als Analysengefäß den Nachteil, daß die zumeist farblosen oder transparenten Proben nach Einpipettierung in die Näpfe der Platte kaum noch zu erkennen sind. Demzufolge kann es auch sehr leicht zu Fehlpipettierungen durch unterbliebene oder doppelte Probenzugabe kommen, was zu falsch-negativen bzw. falsch-positiven Ergebnissen führen würde.

Der Erfindung liegt demgemäß die Aufgabe zugrunde, ein Analysengefäß zur Aufnahme von zu analysierenden Flüssigkeiten zur Verfügung zu stellen, welches mit Mitteln zur Anzeige des Befüllungszustandes ausgestattet ist, die selbst bei kleinen Probenvolumina sicher anzeigen, ob sich bereits zu analysierende Flüssigkeit in dem Gefäß befindet.

Diese Aufgabe wird überraschenderweise durch das Analysengefäß gemäß den Ansprüchen 1 bis 8 gelöst. Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das Verfahren zur Herstellung des Analysengefäßes nach den Ansprüchen 9 bis 14 sowie die Verwendung eines pH-Indikators als Mittel zur Anzeige des Befüllungszustandes eines Analysengefäßes für Flüssigkeiten nach Anspruch 15.

Das erfindungsgemäße Analysengefäß zur Aufnahme von zu analysierenden Flüssigkeiten und mit Mitteln zur Anzeige des Befüllungszustandes ist dadurch gekennzeichnet, daß als Mittel zur Anzeige des Befüllungszustandes ein pH-Indikator auf zumindest Teilen der Oberflächen des Analysengefäßes, welche mit den Flüssigkeiten in Kontakt kommen, aufgebracht ist.

Bevorzugte pH-Indikatoren sind solche, die bei dem pH-Wert der zu analysierenden Flüssigkeiten farbig sind und insbesondere solche, die im pH-Bereich von 6,5 bis 7,5 farbig sind. Besonders bevorzugte pH-Indikatoren sind Bromkresolpurpur, Bromphenolrot, Kresolrot, p-Nitrophenol, Phenolrot und/oder Neutralrot.

Zur Verbesserung der Haftung des pH-Indikators auf den Oberflächen des Analysengefäßes wird der pH-Indikator vorzugsweise in Kombination mit einer an den Oberflächen haftenden Matrixsubstanz eingesetzt. Diese Matrixsubstanz ist vorzugsweise so beschaffen, daß sie zumindest teilweise in den zu analysierenden Flüssigkeiten löslich ist. Bevorzugte Matrixsubstanzen sind Zucker und/oder Zuckeralkohole, insbesondere Sorbit. Sie lösen sich leicht in Wasser und setzen daher bei Kontakt mit wäßrigen Flüssigkeiten den an ihnen haftenden oder in sie eingebundenen pH-Indikator schnell frei. Der pH-Indikator zeigt dann durch Farbumschlag den pH-Wert der zu analysierenden Flüssigkeit und damit deren Gegenwart an.

Das erfindungsgemäße Analysengefäß ist besonders dann von Vorteil, wenn es um die Analyse einer Vielzahl von kleinen Probenmengen, wie zum Beispiel bei immunologischen Reihenuntersuchungen, geht. Demgemäß liegt das erfindungsgemäße Analysengefäß auch insbesondere in Form einer Mikrotiterplatte mit einer Vielzahl von Vertiefungen zur Probenaufnahme vor. Ganz besonders bevorzugt ist das Analysengefäß eine mit immunreaktiver Komponente beschichtete Mikrotiterplatte.

Die Herstellung des erfindungsgemäßen Analysengefäßes erfolgt in der Weise, daß man

- (a) zumindest Teile der Oberflächen des Analysengefäßes, welche mit zu analysierender Flüssigkeit in Kontakt kommen, mit einer Lösung behandelt, die den pH-Indikator enthält,
- (b) die Lösung im wesentlichen entfernt und
- (c) das Analysengefäß trocknet.

Gegebenenfalls kann das Analysengefäß vor Durchführung der Stufe (a) mit zum Beispiel Wasser oder Pufferlösung gewaschen werden.

Zur Durchführung der Stufe (a) wird vorzugsweise ein Volumen an Lösung in das Gefäß eingebracht, welches größer als das Volumen der zu analysierenden Flüssigkeit ist. Die Behandlung des Analysengefäßes mit der Lösung erfolgt vorzugsweise während einer Dauer von 0,5 bis 16 Stunden. Der pH-Indikator wird in der Lösung in einer Menge von vorzugsweise 200 bis 5000 µg/ml, insbesondere 850 bis 2500 µg/ml, eingesetzt.

Danach wird die Lösung in Stufe (b) im wesentlichen entfernt, was vorzugsweise durch Absaugen der Lösung und Ausklopfen der Platten geschieht. Der verbleibende Rest an Lösung bildet nach Trocknung des Analysengefäßes in Stufe (c) eine Schicht des pH-Indikators auf den Oberflächen des Analysengefäßes. Die Ausbildung einer Schicht verläuft besonders einfach, wenn die in Stufe (a) eingesetzte Lösung neben dem pH-Indikator auch eine Matrixsubstanz, insbesondere Sorbit, enthält. Die Matrixsubstanz wird in der Lösung vorzugsweise in einer Menge von 16 bis 20 Gew.-% eingesetzt. Die vorzugsweise wäßrige Lösung hat insbesondere einen pH-Wert im Bereich von 5 bis 9,5.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann insbesondere dazu eingesetzt werden, bereits mit immunreaktiver Komponente beschichtete Mikrotiterplatten mit Mitteln zur Anzeige des Befüllungszustandes in Form eines pH-Indikators auszustatten. Dabei hat es sich herausgestellt, daß die Aufbringung des pH-Indikators auch gleichzeitig mit der Belegung der Mikrotiterplatte mit der immunreaktiven Komponente erfolgen kann. Dies geschieht in einfacher Weise derart, daß in Stufe (a) eine Lösung verwendet wird, die neben dem pH-Indikator auch die immunreaktive Komponente enthält. Auf diese Weise kann bei der Herstellung der fertigen, mit immunreaktiver Komponente beschichteten Mikrotiterplatten ein Verfahrensschritt eingespart werden.

Es ist bevorzugt, daß der eingesetzte pH-Indikator sowie der pH-Wert der Lösung in der Weise ausgewählt werden, daß einerseits das mit dem pH-Indikator ausgestattete Analysengefäß keine oder nur eine geringe Einfärbung durch den pH-Indikator erfährt, andererseits jedoch bei Zugabe der zu analysierenden Flüssigkeit eine deutliche Farbänderung des pH-Indikators durch den pH-Wert der Flüssigkeit erfolgt.

Bevorzugte Indikatoren für fast pH-neutrale Proben, wie zum Beispiel Seren, sind die pH-Indikatoren Bromphenolrot, Kresolrot oder Neutralrot und insbesondere Bromkresolpurpur. Diese werden vorzugsweise in einer Konzentration von 200 bis 5000 µg/ml Lösung, besonders bevorzugt 850 bis 2500 µg/ml Lösung, verwendet. Der pH-Wert der Lösung wird vorzugsweise mit niedrigmolaren Phosphatpuffer-Stammlösungen auf 5,8 bis 6,2, insbesondere ungefähr 6,0, eingestellt.

Wenn die in Stufe (a) des erfindungsgemäßen Verfahrens eingesetzte Lösung zum Beispiel Bromkresolpurpur enthält und einen pH-Wert von 6,0 aufweist, so führt die intensive Gelb/Grünfärbung dieses pH-Indikators bei diesem pH-Wert zu einer leicht gelb/grünen Einfärbung nach Durchführung der weiteren Verfahrensschritte (b) und (c). Diese Einfärbung ist jedoch so schwach, daß im Falle von Mikrotiterplatten diese nach wie vor transparent erscheinen. Nach Einbringen einer Probefflüssigkeit mit einem pH-Wert von ca. 7,0 in das hergestellte Analysengefäß nimmt der unter Auflösung der Matrixsubstanz freigesetzte pH-Indikator wieder seine für einen neutralen pH-Wert typische intensive Blaufärbung an. Diese Verfärbung indiziert in einfacher Weise, daß sich Probenfflüssigkeit in dem Analysengefäß befindet und dient damit als sicheres Mittel zur Anzeige des Befüllungszustandes.

Auf diese Weise können mittels des erfindungsgemäßen Analysengefäßes die gerade bei Reihenuntersuchungen von kleinen Volumina farbloser Proben häufig vorkommenden Fehlpipettierungen in sicherer Weise ausgeschlossen werden. Damit ermöglicht das erfindungsgemäße Analysengefäß den Aufbau einer photometrisch kontrollierten In-Prozess-Kontrolle der Probenzugabe. Es dient demzufolge als wichtiger Beitrag zur Qualitätssicherung zum Beispiel bei Blutbanken und Laborpraxen.

Bei erfindungsgemäß hergestellten Mikrotiterplatten mit immunreaktiver Komponente hat es sich als besonderer Vorteil erwiesen, wenn Sorbit als Matrixsubstanz eingesetzt wird, da dieser Zuckeralkohol die Mikrotiterplatte zudem konserviert.

Nachstehend ist die Erfindung anhand von Beispielen erläutert.

#### Beispiele

##### Beispiel 1

In diesem Beispiel wird das nachträgliche Auftragen des pH-Indikators auf Mikrotiterplatten beschrieben, auf die zuvor bereits eine immunreaktive Komponente aufgebracht wurde.

Zuerst wurden Maxisorb-Flachboden-Mikrotiterplatten der Firma Nunc, Wiesbaden-Biebrich, Deutschland, mit 75 µl Immunglobulin M-Rheumafaktor in geeigneter Verdünnung beschichtet. Dann wurden die Platten zweimal mit jeweils 200 µl wäßriger Tris(hydroxymethylaminomethan)-Pufferlösung (pH 7,0) gewaschen, welche 0,05 Vol.-% Tween® 20 enthielt. Dann wurden die Platten dreimal auf mehreren Lagen Zellstoff ausgeklopft und waren damit für das Aufbringen des pH-Indikators vorbereitet.

Dieses erfolgte durch Einpipettieren von 100 µl/Napf von einer wäßrigen Lösung, die die folgende Zusammensetzung hatte:

1 mM Phosphatpuffer (pH-Wert 6,0)

18 Gew.-% Sorbit

850 µg/ml Bromkresolpurpur

Diese Lösung hatte eine intensive gelb/grüne Farbe.

Die befüllten Mikrotiterplatten wurden anschließend 1 Stunde lang bei 2 bis 8°C inkubiert. Danach wurde die Indikatorlösung abgesaugt, die Platten wurden dreimal auf einigen Lagen Zellstoff ausgeklopft und im Trockenschrank 3 Stunden lang bei 37°C getrocknet. Es lagen damit Mikrotiterplatten vor, die ohne Vorwaschung im ELISA eingesetzt werden konnten. Durch Einschweißung unter Vakuum in passende Aluminiumbeutel waren sie über einen längeren Zeitraum stabil.

Bei Durchführung eines ELISA-Tests mit diesen Mikrotiterplatten zur Bestimmung von Immunglobulin G-Antikörpern gegen das Cytomegalie-Virus (CMV) wurden mit 3 Kontrollseren die in der nachstehenden Tabelle aufgeführten Extinktions-Werte ermittelt. Trotz des Vorhandenseins des pH-Indikator unterschieden sich die Meßwerte der erfindungsgemäßen Platte mit pH-Indikator nicht signifikant von denen einer herkömmli-

chen Platte ohne pH-Indikator.

Tabell I

Serum	Extinktionen	
	Platte mit pH-Indikator	Platte ohne pH-Indikator
Negativkontrolle	0,007	0,011
Grenzwertkontrolle	0,211	0,205
Positivkontrolle	2,283	2,194

Die in Mengen von jeweils 10 µl eingesetzten, farblosen Kontrollseren führten bei der erfindungsgemäßen Mikrotiterplatte stets zu einer deutlichen Blaufärbung.

Beispiel 2

In diesem Beispiel wird die gleichzeitige Beschichtung einer Mikrotiterplatte mit der immunreaktiven Komponente und dem pH-Indikator beschrieben. Aufgrund dieser Verfahrensweise mußte die Platte nur einmal mit Lösung inkubiert werden.

Es wurden Maxisorb-Rundboden-Mikrotiterplatten der Firma Nunc, Wiesbaden-Biebrich, Deutschland, mit 75 µl/Napf einer Lösung der folgenden Zusammensetzung befüllt:

5 mmol wäßriger Phosphatpuffer (pH-Wert 6,0)  
 18 Gew.-% Sorbit  
 Rheumafaktor-Präparation  
 20 µg/ml bovines Serumalbumin (BSA)  
 850 µg/ml Bromkresolpurpur

3 Stunden lang bei 37°C im Trockenschrank getrocknet. Die Platten wurden für eine gute Langzeitstabilität in passende Aluminiumbeutel eingeschweißt.

Ein ELISA-Test der in Beispiel 1 beschriebenen Art mit 3 Kontrollseren ergab die in der nachstehenden Tabelle II aufgeführten Extinktionswerte. Zum Vergleich sind ebenfalls die mit einer herkömmlichen Platte ohne pH-Indikator erhaltenen Werte angegeben.

Tabelle II

Serum	Extinktionen	
	Platte mit pH-Indikator	Platte ohne pH-Indikator
Negativkontrolle	0,017	0,011
Grenzwertkontrolle	0,134	0,295
Positivkontrolle	1,936	2,366

Es zeigt sich, daß die bei gleichzeitiger Inkubation mit pH-Indikator und immunreaktiver Komponente hergestellten Platten nach wie vor eine sehr gute Differenzierung zwischen den 3 Kontrollseren gestatten, auch wenn sie nicht die gleiche Leistungsfähigkeit wie herkömmliche Platten ohne pH-Indikator oder die erfindungsgemäßen, nachträglich mit pH-Indikator beschichteten Platten gemäß Beispiel 1 haben.

In allen Fällen führte die Zugabe der Seren jedoch zu einer gut erkennbaren Blaufärbung des pH-Indikators.

## Beispiel 3

Es wurden Flachboden-Mikrotiterplatten in der in Beispiel 2 beschriebenen Weise hergestellt und getestet, wobei jedoch die Konzentration von Bromkresolpurpur von 850 auf 270 µg/ml reduziert wurde.

Die mit derart hergestellten Platten erhaltenen Extinktions-Werte sind in der nachstehenden Tabelle III 5 zusammengestellt.

Tabelle III

Serum	Extinktionen	
	Platte mit pH-Indikator	Platte ohne pH-Indikator
Negativkontrolle	0,011	0,012
Grenzwertkontrolle	0,115	0,222
Positivkontrolle	1,355	1,936

Trotz weiterer Einbußen der Leistungsfähigkeit im ELISA gegenüber herkömmlichen Platten ergab die Probenzugabe in die einzelnen Näpfe auch bei der reduzierten Bromkresolpurpurkonzentration noch eine deutliche Blaufärbung.

## Patentansprüche

1. Analysengefäß zur Aufnahme von zu analysierenden Flüssigkeiten und mit Mitteln zur Anzeige des Befüllungszustandes, dadurch gekennzeichnet, daß als Mittel zur Anzeige des Befüllungszustandes ein pH-Indikator auf zumindest Teilen der Oberflächen des Analysengefäßes, welche mit den Flüssigkeiten in Kontakt kommen, aufgebracht ist.
2. Analysengefäß nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der pH-Indikator Bromkresolpurpur, Bromphenolrot, Kresolrot, p-Nitrophenol, Phenolrot und/oder Neutralrot ist.
3. Analysengefäß nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der pH-Indikator in Kombination mit einer Matrixsubstanz vorhanden ist, welche an den Oberflächen des Analysengefäßes haftet.
4. Analysengefäß nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Matrixsubstanz zumindest teilweise in den Flüssigkeiten löslich ist.
5. Analysengefäß nach Anspruch 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Matrixsubstanz ein Zucker und/oder ein Zuckeralkohol ist.
6. Analysengefäß nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Zuckeralkohol Sorbit ist.
7. Analysengefäß nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Mikrotiterplatte ist.
8. Analysengefäß nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß es eine mit immunreaktiver Komponente beschichtete Mikrotiterplatte ist.
9. Verfahren zur Herstellung des Analysengefäßes gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß man
  - (a) zumindest Teile der Oberflächen des Analysengefäßes, welche mit zu analysierender Flüssigkeit in Kontakt kommen, mit einer Lösung behandelt, die den pH-Indikator enthält,
  - (b) die Lösung im wesentlichen entfernt und
  - (c) das Analysengefäß trocknet.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man in Stufe (a) eine Lösung einsetzt, die pH-Indikator und Matrixsubstanz enthält.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Lösung mit einem pH-Wert im Bereich von 5—9,5 einsetzt.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Lösung einsetzt, die 16 bis 20 Gew.-% Matrixsubstanz enthält.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß man als Analysengefäß eine bereits mit immunreaktiver Komponente beschichtete Mikrotiterplatte einsetzt.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß man als Analysengefäß eine Mikrotiterplatte einsetzt und in Stufe (a) eine Lösung verwendet, die eine immunreaktive Komponente enthält.
15. Verwendung eines pH-Indikators als Mittel zur Anzeige des Befüllungszustandes eines Analysengefäßes für Flüssigkeiten, wobei der pH-Indikator auf zumindest Teile der Oberflächen des Analysengefäßes aufgebracht wird, welche mit den Flüssigkeiten in Kontakt kommen.

- Leerseite -